

# 盐藻在气升式光生物反应器中的光自养培养

郝建欣, 丛威, 康瑞娟, 蔡昭铃

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

**摘要:**在气升式光生物反应器中进行了盐藻培养特性的研究, 确定了盐藻在 2.5 L 气升式光生物反应器中培养的适宜条件为: 温度 30°C, 光强 1.6 mW/cm<sup>2</sup>, 盐浓度 16%, 通气量 20 ml/min. 扩大到 20 L 反应器培养盐藻生长良好. 采用气升式光反应器培养盐藻生长快, 周期短, 4~7 d 后即可进入稳定期; 最终细胞密度大, 最大为 1.6×10<sup>6</sup> cells/ml; 藻液中胡萝卜素含量高, 最高含量 32 mg/L. 实验表明气升式光生物反应器适合于盐藻的培养.

**关键词:**气升式光生物反应器; 盐藻; 胡萝卜素

中图分类号: Q949.21

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2002)05-0443-05

## 1 前言

杜氏盐藻能在高盐高温高光照等极端条件下生长并大量积累β-胡萝卜素<sup>[1]</sup>, 在我国及世界上很多国家已成功实现大面积培养, 进入了产业化<sup>[2]</sup>. 但用于开放式生产池的藻种大部分采用室外种池逐级培养扩种的方式, 受气候、自然光照、天敌等多种环境因素限制, 可控性差, 生长缓慢, 细胞密度低, 培养周期长, 易受各种微生物污染, 藻种质量差, 活力低, 直接影响大生产池培养的效率. 利用光生物反应器进行藻种可控培养已成为保证盐藻大规模稳定生产的关键. 单细胞藻类的生物反应器培养已有不少研究<sup>[3,4]</sup>, 但有关盐藻的光生物反应器培养的研究却很少报道. 本工作在 2.5 和 20 L 气升式光生物反应器中进行了盐藻培养实验, 探索了气升式光生物反应器培养盐藻的条件, 为利用反应器进行开放式生产池的藻种制备或规模培养提供了实验依据及相关技术.

## 2 材料和方法

### 2.1 气升式光生物反应器

#### 2.1.1 2.5 L 气升式光生物反应器

反应器由耐热玻璃制成, 可进行高压蒸汽灭菌. 罐体高 40 cm, 直径 9 cm, 气体提升管直径 5.5 cm, 高 30 cm. 反应器总体积 2.5 L, 有效体积 2 L. 以日光灯作为外加光源, 由日光灯的数量调节光强大小. 空气和 CO<sub>2</sub> 定量混合后通入反应器, 进气管底部为孔径 80 μm 的玻璃气体分布器. 罐体下部设有恒温循环水夹套, 通入恒温水以维持培养温度.

#### 2.1.2 20 L 气升式光生物反应器

反应器由罐体、气体提升管、内光源密封管、热交换装置、气体分布器、内外光源等部分组成. 罐体、气体提升管和内光源密封管由耐热玻璃制作, 可进行蒸汽消毒. 以日光灯作为内外光源. 罐体高 100 cm, 直径 16 cm, 总体积 20 L, 有效体积 16 L. 底部设有不锈钢烧结板制成的圆形气体分布器, 空气和 CO<sub>2</sub> 定量混合后通入反应器, 并配置溶氧、pH、温度等在线检测系统. 几何参数如下: 高径比(H/D)6.25, 提升管截面积 A<sub>r</sub> 与下降截面积 A<sub>d</sub> 比值为 1.1, 气体分布器直径 5 cm, 分布器孔径 80 μm, 光照面积与体积的比值为 35 m<sup>-1</sup>.

收稿日期: 2002-03-20, 修回日期: 2002-06-20

作者简介: 郝建欣(1976-), 女, 河北新乐市人, 硕士研究生, 生物化工专业; 丛威, 通讯联系人.

## 2.2 培养条件及测定方法

### 2.2.1 藻种及培养条件

盐藻(*Dunaliella salina*)由内蒙古兰太生物工程公司提供,经纯化后使用。

藻种保存:用三角瓶于 HZQ-QG 型温控培养箱中荧光灯上下照光培养,平均光强  $8 \text{ mW/cm}^2$ , 温度  $32^\circ\text{C}$ , 采用 ASP<sub>2</sub> 培养基<sup>[5]</sup>, NaCl 浓度 12%。固体平板培养基同液体培养基,加 2%琼脂。

### 2.2.2 生物量及胡萝卜素测定

以细胞数作为确定生物量的指标,采用血球计数法计数,每个样计 4 个板,取平均值。胡萝卜素和叶绿素用 90%丙酮提取,测量方法参考文献[6]。

### 2.2.3 光衰减的测量

取不同浓度的藻液,在直径 58 mm 的玻璃容器中,以日光灯为光源,用光合有效辐射计(FGH-1 型,北京师范大学光电仪器厂)测量光通过不同密度和不同厚度藻液时的衰减情况。

## 3 实验结果及讨论

### 3.1 2.5 L 气升式光生物反应器培养

#### 3.1.1 通气量对盐藻生长的影响

在温度  $30^\circ\text{C}$ 、盐浓度 12%、接种密度  $0.5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 、平均光照强度  $1.6 \text{ mW/cm}^2$ 、混合气体中  $\text{CO}_2$  浓度约 6% 的培养条件下考察了 3 种通气量对盐藻生长的影响,同时与摇瓶培养进行比较,摇瓶培养过程中每天人工摇动 1 次。藻细胞密度随培养时间的变化见图 1。由图可知,通气量对盐藻的生长有显著影响,在  $20 \text{ ml/min}$  的通气条件下,盐藻生长几乎没有迟滞期而直接进入对数生长期,4 d 后进入稳定期,最高细胞密度达  $6 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ ,是初始接种密度的 10 倍以上,通气量 100 和  $200 \text{ ml/min}$  条件下也在 4 d 后达到稳定期,最大生物量为  $3.5 \times 10^5$  和  $1.5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 。由于盐藻没有细胞壁,对剪切力的耐受力极为有限,所以在保证培养液正常循环流动的前提下,采用小通气量才能使藻体生长良好。3 种通气量条件下盐藻生长周期都较短,培养 4 d 左右均达到指数生长末期,摇瓶培养则需 8 d,培养周期是反应器培养的 2 倍。实验过程中每天测定 pH 值,摇瓶培养 pH 稳定在 8~9 之间,而反应器培养由于  $\text{CO}_2$  的通入, pH 偏低,但基本稳定在 7~8 之间。盐藻能耐受较宽的 pH 范围, pH 在 7~8 之间不会对盐藻生长构成太大影响。

#### 3.1.2 温度对盐藻生长的影响

盐藻能在  $0\sim 38^\circ\text{C}$  温度范围内生长<sup>[7]</sup>,在通气量  $20 \text{ ml/min}$ 、接种密度  $8 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ 、盐浓度 12%、平均光照强度  $1.6 \text{ mW/cm}^2$ 、混合气体中  $\text{CO}_2$  浓度约 6% 的条件下考察了 3 种温度对盐藻生长的影响(图 2)。3 种温度条件下盐藻都经过 1 d 的停滞期后开始快速增长,4 d 后达到指数生长末期,之后细胞浓度基本维持在一定范围内。 $30^\circ\text{C}$  条件下最大细胞浓度为  $13 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ ,高于另外 2 个温度。实验中从第 4 d 开始考察藻液内胡萝卜素含量,连续考察了 9 d(图 3)。由图可知,随着培养时间的延长,单位体积藻液中胡萝卜素含量逐渐增高, $30^\circ\text{C}$  条件下胡萝卜素含量始终高于另外两个温度,12 d 后达  $32 \text{ mg/L}$ ,表明  $30^\circ\text{C}$  是反应器培养盐藻的适宜温度。

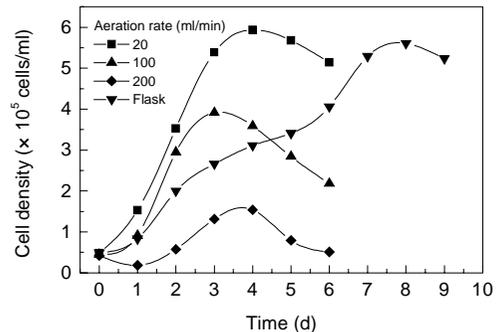


图 1 2.5 L 反应器内不同通气量培养和摇瓶培养所得盐藻生物量比较

Fig.1 The growth of *D.salina* under different aerating rates in flask

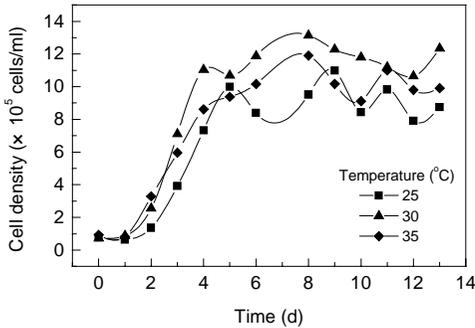


图 2 温度对盐藻生长的影响

Fig.2 Effect of temperature on the growth of *D. Salina*

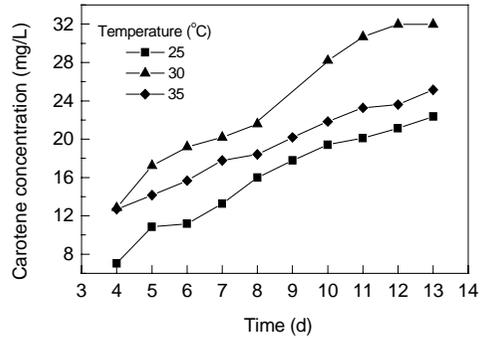


图 3 不同温度下单位体积藻液中胡萝卜素含量

Fig.3 The comparison of carotene contents under different temperatures

### 3.1.3 盐浓度对盐藻生长的影响

摇瓶培养中初步考察了 5%~25%盐浓度对盐藻生长的影响, 得出摇瓶条件下盐藻生长的最适盐浓度为 12%。在温度 30°C、接种密度  $8 \times 10^4$  cells/ml、通气量 20 ml/min、平均光照强度  $1.6 \text{ mW/cm}^2$ 、混合气体中  $\text{CO}_2$  浓度约 6%的培养条件下考察了 3 种盐浓度下盐藻在气升式反应器中的生长情况(图 4)。实验结果表明, 3 种盐浓度条件下培养前期盐藻生长情况差别不大, 后期 16%盐浓度时生物量略大, 为  $12.5 \times 10^5$  cells/ml, 8%和 12%盐浓度下最高细胞密度为  $8.8 \times 10^5$  和  $11.5 \times 10^5$  cells/ml, 3 种盐浓度下细胞密度均增长 10 倍以上。由于 12%和 16%盐度培养情况相差不大, 所以反应器培养实验中仍可采用 12%盐浓度, 但在大规模生产中为避免污染, 宜采用较高盐浓度。

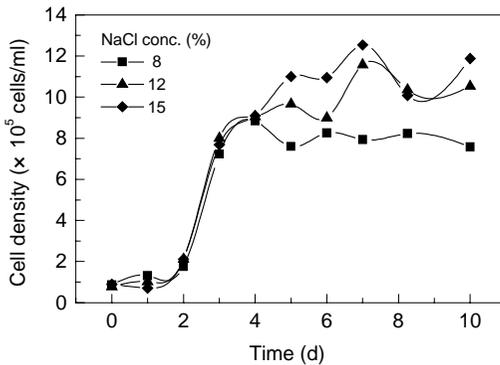


图 4 盐浓度对盐藻生长的影响

Fig.4 Effects of different NaCl concentrations on the growth of *D. salina*

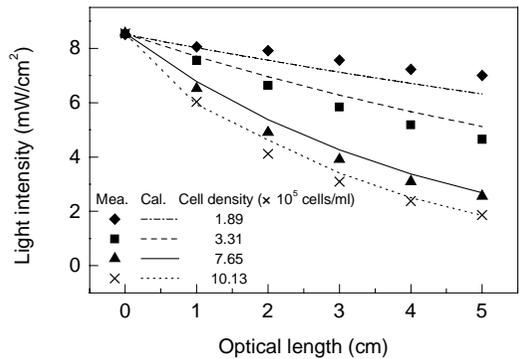


图 5 光强的计算值与实测值比较

Fig.5 The comparison of calculated values and measured values of light intensities

### 3.1.4 光强在培养液中的衰减

光因子的引入是盐藻培养的重要特征。已有的研究表明, 高光强有利于胡萝卜素的积累, 但不利于盐藻的生长, 要得到高密度藻液并同时保持细胞内高胡萝卜素含量就必须寻找合适的培养光强, 因此了解光在培养系统中的衰减规律对过程调控极为重要。在盐藻培养体系中, 以  $8.5 \text{ mW/cm}^2$  初始入射光强, 分别测量了不同细胞密度和不同藻液厚度(光程距离)对光的衰减的影响, 结果如图 5 所示。由图可见, 随着藻细胞密度和光路长度的增加, 光强迅速下降。这一结果表明,

在同一光程距离处, 光强是随着藻细胞密度的增加而变化的, 培养初期, 藻细胞密度小, 光衰减程度低, 而培养后期, 随着藻细胞密度的增大, 藻细胞的阻光作用增强, 光衰减严重。

将上述结果进行回归分析, 即得到在盐藻培养液中光强随光程距离和细胞密度衰减的关联式:

$$I = I_0 \exp[(0.0041 - 3 \times 10^{-7} C)L], \quad (1)$$

其中  $C$  为细胞密度(cells/ml),  $I_0, I$  为初始和一定光程距离上的光强( $\text{mW}/\text{cm}^2$ ),  $L$  为光程距离(cm)。

由式(1)计算的不同光程距离和藻细胞密度下的  $I$  值与实测值比较, 结果见图 5。由图可知, 计算值和实测值能够较好地吻合, 误差在 10% 以内, 表明所获得的光衰减关联式能够较好地描述光强在盐藻培养液中随光程距离和藻细胞密度的变化情况。

### 3.1.5 光强对盐藻生长的影响

在接种密度  $8 \times 10^4$  cells/ml、温度  $30^\circ\text{C}$ 、通气量  $20 \text{ ml}/\text{min}$ 、混合气体中  $\text{CO}_2$  浓度约 6%、盐浓度 12% 的培养条件下考察了 3 种光强条件对盐藻生长的影响, 所得盐藻生长曲线如图 6 所示。由图可知, 在实验的光强范围内, 较高的光强有利于细胞的生长,  $1.6 \text{ mW}/\text{cm}^2$  的光强下所得最大细胞密度为  $9 \times 10^5$  cells/ml 而低于  $0.8 \text{ mW}/\text{cm}^2$  的光强下最大细胞密度仅为  $3 \times 10^5$  cells/ml。培养 4 d (对数生长末期) 后测定胡萝卜素含量, 单位细胞胡萝卜素含量随培养光强的增加而增加, 分别为 3.93、5.08 和  $11.78 \text{ pg}/\text{cell}$ , 表明高光强也有利于胡萝卜素的积累。

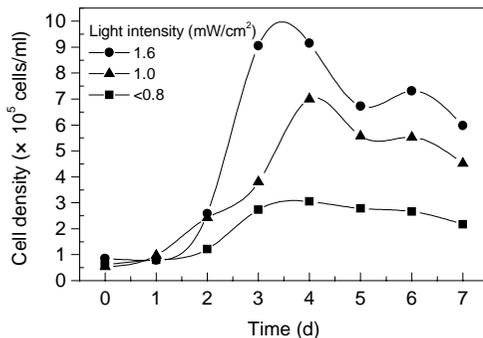


图 6 光照强度对盐藻生长的影响

Fig.6 Effect of light intensity on the growth of *D. salina*

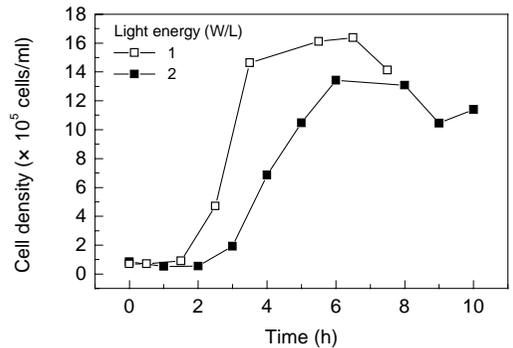


图 7 不同光能下盐藻在 20 L 反应器中的生长

Fig.7 The growth of *D. salina* in 20 L airlift photobioreactor under different light energies

### 3.2 盐藻在 20 L 气升式反应器中的培养

在温度  $30^\circ\text{C}$ 、接种密度  $8 \times 10^4$  cells/ml、通气量  $100 \sim 120 \text{ ml}/\text{min}$ 、盐浓度 12%、混合气体中  $\text{CO}_2$  浓度约 6% 的条件下考察了 2 种不同光强下盐藻在 20 L 气升式光生物反应器中的生长特性, 高光强条件下藻液平均所得光能为  $2 \text{ W}/\text{L}$ , 低光强条件下藻液平均所得光能为  $1 \text{ W}/\text{L}$ 。实验结果如图 7 所示。与 2.5 L 反应器相比, 由于培养混合时间等方面的差异, 盐藻在 20 L 反应器中延滞期较长, 高光强条件下盐藻延滞期 1~2 d, 低光条件下延滞期 2~3 d, 而 2.5 L 反应器中为 1 d。延滞期后盐藻开始快速生长, 高光强条件下最大比生长速率为  $4.16 \text{ d}^{-1}$ , 4~5 d 后即达到指数生长末期, 最大细胞浓度为  $1.6 \times 10^6$  cells/ml, 培养 7 d 后藻液中胡萝卜素含量为  $22 \text{ mg}/\text{L}$ 。低光条件下培养 6~7 d 后达到指数生长末期, 整个培养周期比高光条件推迟 1~2 d, 最高细胞浓度达  $1.34 \times 10^6$  cells/ml, 最大比生长速率  $2.56 \text{ d}^{-1}$ 。实验结果表明  $2 \text{ W}/\text{L}$  比  $1 \text{ W}/\text{L}$  有利于盐藻在 20 L 气升式光生物反应器中

的生长,但较低的光强条件下也达到了较高的细胞密度. 目前生产上的开放式跑道池中盐藻培养周期 10~15 d, 细胞密度仅 $(4\sim 5)\times 10^5$  cells/ml, 胡萝卜素含量 10~20 mg/L, 因此采用气升式光生物反应器培养盐藻, 尤其用于藻种制备可缩短培养周期, 提高培养效率.

## 4 结 论

本文研究了盐藻在气升式光反应器中的培养特性, 实验结果表明:

(1) 2.5 L 气升式光反应器培养盐藻的适宜条件为: 温度 30°C, 平均光照强度 1.6 mW/cm<sup>2</sup>, 盐浓度 16%, 通气量 20 ml/min, 接种密度  $8\times 10^4$  cells/ml.

(2) 气升式光反应器培养盐藻周期短, 生长速度快, 细胞密度高, 胡萝卜素含量高. 实验条件下培养周期 4~7 d, 最大比生长速率  $4.16\text{ d}^{-1}$ , 最高胡萝卜素含量 32 mg/L, 最大细胞密度为  $1.6\times 10^6$  cells/ml, 表明气升式光生物反应器适合于盐藻的培养.

(3) 光强在盐藻培养液中随光程距离和细胞密度衰减关联式为:  $I=I_0\exp[(0.0041-3\times 10^{-7}C)L]$ .

参考文献:

- [1] Borowitzka L J, Borowitzka M A, Moulton T. Mass Culture of *Dunaliella*: from Laboratory to Pilot Plant [J]. Hydrobiologia, 1984, 116/117: 115-121.
- [2] Schlipalius L. The Extensive Commercial Cultivation of *Dunaliella salina* [J]. Bioresource Technology, 1991, 38(2/3): 241-243.
- [3] Borowitzka M A. Commercial Production of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes and Fermenters [J]. J. Biotechnol., 1999, 70: 313-321.
- [4] Ben-Amotz A, Avron M. The Biotechnology of Cultivation the Halotolerant Alga *Dunaliella* [J]. Trends in Biotechnology, 1990, 8: 121-125.
- [5] 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用 [M]. 北京: 农业出版社, 1980. 306-307.
- [6] Jensen A. Chlorophylls and Carotenoids [A]. Hellebust J A, Craigie J S. Handbook of Phycological Methods [C]. Cambridge: Cambridge University Press, 1978. 59-70.
- [7] Borowitzka M A, Borowitzka L J. *Dunaliella* [A]. Borowitzka M A, Borowitzka L J. Microalga Biotechnology [C]. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 27-58.

## Cultivation of *Dunaliella salina* in an Airlift Photobioreactor

HAO Jian-xin, CONG Wei, KANG Rui-juan, CAI Zhao-ling

(State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, CAS, Beijing 100080, China)

**Abstract:** The growth of *Dunaliella salina* in an airlift photobioreactor was examined. From the experiments the suitable growth conditions were obtained: temperature of 30°C, light intensity 1.6 mW/cm<sup>2</sup>, NaCl concentration 12%, CO<sub>2</sub> concentration about 6% in mixed feed gas, and aerating rate 20 ml/min. The growth rate of *D. salina* in the airlift photobioreactor was higher than in the flask, the maximum specific growth rate was  $4.16\text{ d}^{-1}$ . The cultivation was completed within 4~7 d, the maximum cell density was  $1.6\times 10^6$  cells/ml, and the highest carotene concentration up to 32 mg/L.

**Key words:** airlift photobioreactor; *Dunaliella salina*; carotene